Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINBAU VON ^{32}P IN SÄURELÖSLICHE NUCLEOTIDE IN LEUKOZYTEN DES PERIPHEREN BLUTES UND LYMPHOBLASTOIDEN KULTURZELLEN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

GUNTHER HOFFMANN

aus Lüneburg

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0085

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINBAU VON ^{32}P IN SÄURELÖSLICHE NUCLEOTIDE IN LEUKOZYTEN DES PERIPHEREN BLUTES UND LYMPHOBLASTOIDEN KULTURZELLEN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GUNTHER HOFFMANN
aus Lüneburg

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. H.– E. Hoffmeister
Berichterstatter:	Professor Dr. K. Wilms
	(Professor Dr. H.D. Waller)

gedruckt und geschrieben bei Hans-Joachim Köhler, Reprografischer Betrieb , 7400 Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Untersuchungsziel	1
1.2.	Erläuterungen zum Nucleinsäurestoffwechsel	2
2.	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.	Untersuchungsmaterial	8
2.2.	Präparation der Zellen des peripheren Blutes	9
2.2.1.	Leukozytenpräparation	9
2.2.2.	Erythrozytenpräparation	9
2.2.3.	Thrombozytenpräparation	10
2.2.4.	Inkubation mit ^{32}P	10
2.2.5.	Trennung der Nucleotide und Messung des Einbaus	11
2.2.6.	Fluorometrische ATP-Bestimmung	12
2.2.7.	Statistische Methoden	13
3.	ERGEBNISSE	14
3.1.	Vitalitätsprüfung	14
3.2.	Chromatographische Identifizierung der Nucleotide	16
3.3.	Prüfung des ^{32}P-Einbaus unter verschiedenen Bedingungen	18
3.4.	Einbau von ^{32}P in Nucleotide von Blut- und Kulturzellen	22
4.	DISKUSSION	25
5.	ZUSAMMENFASSUNG	30
6.	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	31
7.	LITERATURVERZEICHNIS	33

1. EINLEITUNG

1.1 Untersuchungsziel

Die Vermehrung gesunder als auch neoplastisch entarteter Zellen ist biochemisch gekoppelt an die identische Replikation von DNA. Hierzu notwendig ist die ausreichende Bereitstellung von Nucleotiden, zu deren Synthese der Zelle zwei Stoffwechselwege zur Verfügung stehen: a) die de-novo-Synthese und b) der salvage pathway (Erläuterungen hierzu s.u.).

Die Hypothese, daß die Karzinogenese durch Veränderungen am Genom somatischer Zellen ausgelöst werde, ist wesentlicher Anlaß zu intensiven cytologischen und biochemischen Untersuchungen der Zellkerne von Tumorzellen mit dem Ziel, Abweichungen im Stoffwechselverhalten von Zellen aus neoplastischem Gewebe im Vergleich von solchen aus gesundem Gewebe in Erfahrung zu bringen.

Bisher gelang es leider nicht, qualitative Unterschiede im Nucleinsäurestoffwechsel solcher neoplastischer Zellen nachzuweisen, die Einblicke in die Tumorgenese ermöglichen würden. Die bisherigen Untersuchungen brachten aber eine große Zahl quantitativer Unterschiede zutage, die für die Anwendung der Chemotherapie neoplastischer Prozesse nutzbar gemacht werden.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines Forschungsprogramms, das die unterschiedlichen Stoffwechselwege, nämlich a) die de-novo-Synthese und b) den salvage pathway bei verschieden proliferierenden Zellpopulationen durch Einsetzen wechselnder, radioaktiv markierter Vorstufen untersuchen sollte. Bei dieser Arbeit wurde radioaktives Phosphat eingesetzt in der Vorstellung, daß mit der Messung des ^{32}P-Einbaus beide Stoffwechselwege und damit die Bruttosynthese erfaßt würden, und daß sich durch Vergleich der Einbauraten in die Nucleotide aus den verschiedenen Zellpopulationen möglicherweise Rückschlüsse auf ein differierendes Stoffwechselverhalten ergeben würden.

1.2 Erläuterungen zum Nucleinsäurestoffwechsel

Im Rahmen des Zellwachstums und der Zellteilung ist es notwendig, daß die Chromosomen und damit die in ihnen enthaltene DNA als Träger der genetischen Information identisch repliziert werden. Voraussetzung für den Ablauf dieser Synthese ist eine ausreichende Bereitstellung der benötigten Vorstufen sowie eine genügende DNA-Polymerase-Aktivität. Vor der DNA-Verdoppelung kommt es daher zu einem starken Ansteigen der Desoxyribotide und der DNA-Polymerase. Die Bildung der ersteren wird durch große Aktivittätssteigerungen der entsprechenden Enzyme möglich, vor allem der Thymidinkinase, der bei der Steuerung der DNA-Synthese wohl eine besondere Rolle zukommt (22).

Die Zelle verfügt über zwei Möglichkeiten zur Synthese der Nucleotide, die für den Einbau in die DNA benötigt werden (3, 10, 12):

a) die de-novo-Synthese
b) der salvage pathway

Dies soll mit Hilfe von Skizzen kurz erläutert werden (Fig. 1 und 2). Zu a) Unter de novo Synthese versteht man den schrittweisen Aufbau aus kleinmolekularen Substanzen bis zum einbaufertigen Nucleotid.

Bei der Biosynthese des Pyrimidine wird aus Carbamylphosphat und Asparaginsäure nach Bildung von Dihydroorotsäure Orotsäure gebildet, erst nach Fertigstellung des Pyrimidinringes kommt es zur Anlagerung des Ribosephosphates. Die anschließende Decarboxylierung führt zum Uridinmonophosphat. Nach weiterer Phosphorylierung entstehen dann die Nucleotide des Cytosins und des Thymin. Die Reduktion der Ribose zur Desoxyribose findet auf der Stufe des Nucleosiddiphosphates statt.

Fig. 1 zeigt u.a. die notwendigen Reaktionsschritte für die Pyrimidinsynthese in vereinfachter Form.

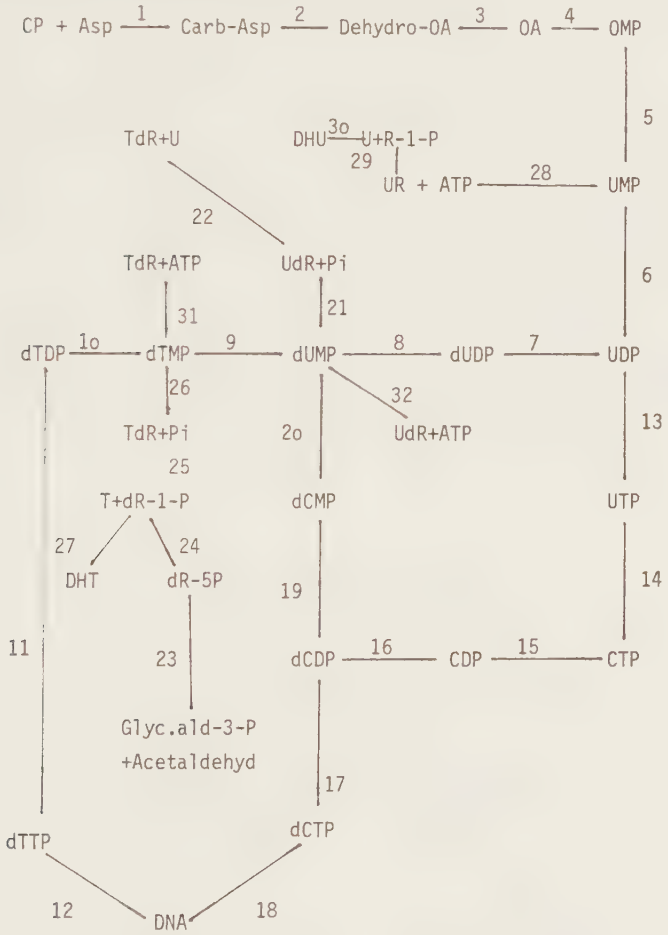

Fig.1.: Die Synthese und der Metabolismus der Pyrimidinnucleotide

Die Zahlen bedeuten spezifische Enzyme: 1 Aspartattranscarbamylase, 2 Dihydroorotase, 3 Dihydroorotsäuredehydrogenase, 4 Orotidin-5-P-Pyrophosphorylase, 5 Orotidin-5-P-Decarboxylase, 7 u. 16 Ribonucleotid-Reductasen, 6 u. 13 Uridylat-Kinasen, 9 Thymidylat-Synthetasen, 10 u. 11 Thymidylat-Kinasen, 12 u. 18 DNA-Polymerasen,

20 Desoxycytidin-Desaminase, 21 u. 26 Pyrimidin-Phosphatasen, 23 Desoxyriboaldolase, 24 Desoxyribophosphomutase, 27 u. 30 Dihydrogenasen, 22 Pyrimidin-Desoxyribosyltransferase, 25 Thymidin-Phosphorylase, 31 u. 32 Thymidin-Kinasen, 28 Uridin-Kinase, 29 Uridinphosphorylase.

Die Biosynthese des Puringerüstes (Fig. 2) ist eine schrittweise Synthese, die vom Ribose-5-Phosphat ausgeht. Die Purinstruktur wird anschließend durch successive Anlagerung kleinster Molekülgruppen erreicht in Form des Inosin-5-Phosphates. Hier gabelt sich der Reaktionsweg: Über Adenylbernsteinsäure als Zwischenprodukt wird Adenosinmonophosphat (ATP), über Xanthosinmonophosphat (XMP) wird Guanosinmonophosphat erreicht. Es folgt dann jeweils die Phosphorylierung bis zum Nucleosidtriphosphat, da der Einbau nur auf dieser Stufe stattfinden kann. Die Reduktion des Zuckers findet vorher auf der Stufe des Nucleosiddiphosphates statt.

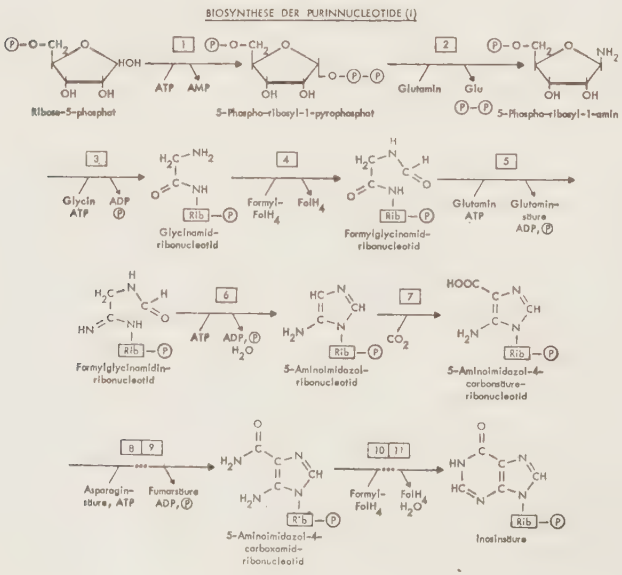

Fig. 2:

Die Zahlen bedeuten folgende spezifische Enzyme:

1 = Ribose-5-Phosphat-ATP-Pyrophosphatkinase

2 = Glutaminphosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase

3 = 5-Phosphoribosyl-1-amin-Glycintransferase

4 = Glycinamidribonucleotid-Transformylase

5 = Formylglycinamidribonucleotid-Glutamin-Amidotransferase

6 = Formylglycinamidribonucleotid-Zyklase

7 = 5-Aminoimidazolribonucleotid-Carboxytransferase

8 = 5-Aminoimidazol-4-N-succinocarboxamidribonucleotid-Synthetase

9 = 5-Aminoimidazol-4carboxamidribonucleotid-Lyase

10 = 5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonucleotid-Transformylase

11 = Inosinicase

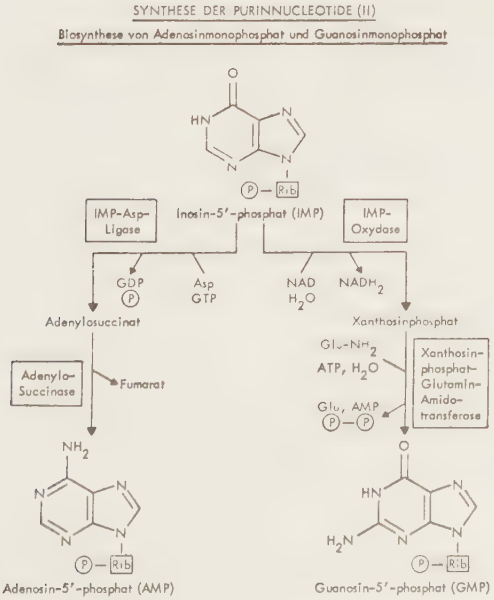

Fig 2:
(Forts.)

zu b) Unter salvage pathway versteht man die Fähigkeit der Zelle, fertige Purin- und Pyrimidinbasen, die beispielsweise durch den Abbau oder durch exogene Zufuhr zur Verfügung stehen, zur Bildung einbaufertiger Nucleotide heranzuziehen. Folgende Beispiele beziehen sich auf den Pyrimidinstoffwechsel: Eine Möglichkeit nämlich zur Synthese des TMP ist auch der direkte Weg, der in der Phosphorylierung des Thymidin besteht, katalysiert durch die Thymidinkinase (s. Fig. 1) (10). Dieses Enzym des salvage pathway scheint z.B. anzusteigen nach Inhibition der de-novo Synthese von TMP durch Aminopterin, womit eine Umgehung des Syntheseweges möglich wäre.

Die relativen Mengenverhältnisse der Enzyme für die de-novo Synthese und für die des salvage pathway sind trotz eingehender Untersuchungen noch nicht klargestellt (5, 6). Jedenfalls spricht viel dafür, daß die Thymidinkinase eine wichtige Rolle bei gesteigertem Zellwachstum spielt.

Die notwendige Bereitstellung von TMP unter Wachstumsbedingungen wird durch weitere folgende Mechanismen begünstigt: 1) vermehrte Bildung von Desoxyribose-5-Phosphat aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetaldehyd, gekoppelt mit einer Umwandlung von Desoxyribose-5-Phosphat in Desoxyribose-1-Phosphat. Bei gleichzeitigem Anwachsen des intrazellulären Thymin (durch Verhinderung des Abbaus zu Dihydrothymin) ist die Thymidin-Bildung begünstigt.

2) Ein weiterer Mechanismus zur erhöhten Bereitstellung von TMP läuft über ein Ansteigen des Uridin, das durch die Thymidinkinase zu dUMP umgewandelt wird. Der weitere Reaktionsablauf entspricht dem der de-novo Synthese (s. Fig. 1).

Für den Purinstoffwechsel der Leukozyten des peripheren Blutes hat der salvage pathway eine größere Bedeutung, weil diese nämlich nur über eine begrenzte Fähigkeit verfügen, die Purinbasen auf dem Weg der de-novo Synthese herzustellen (14, 28).

Die zwei hauptsächlichen Möglichkeiten für den salvage pathway sind in Fig. 3 aufgezeigt, wovon dem ersteren die wohl noch größere Bedeutung zukommt.

Fig.3 Stoffwechselmöglichkeiten für die Purinnucleotidsynthese in Leukozyten (1=Phosphoribosyltransferase, 2= Deoxynucleosidphosphorylase, 3=Kinasen, 4= Reductasen)

Die erste Möglichkeit besteht in der direkten Synthese des Nucleotids aus der Purinbase und Phosphoribosylpyrophosphat mit Hilfe des Enzyms Phosphoribosyltransferase. Die weiteren Schritte sind die Phosphorylierung und die Reduktion der Ribose (7).

Bei der zweiten Möglichkeit reagiert die Purinbase mit Desoxyribose-1-Phosphat und bildet das entsprechende Nucleosid, das anschließend in das Nucleotid überführt wird.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial:

Zur Durchführung dieser Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Zellsysteme benutzt. Als Vertreter einer nicht proliferierenden Zellpopulation wurden Leukozyten des peripheren Blutes genommen. Zu deren Gewinnung wurden freiwillige Spender gewählt, Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, die an keiner hämatologischen Erkrankung litten oder deren Grunderkrankung zu keiner Blutbildveränderung führte. Diesen Spendern wurden 60ml Venenblut entnommen, das dann nach der beschriebenen Methode weiterverarbeitet wurde.

Als Vertreter eines proliferierenden Zellsystems wurden Zellen einer permanenten Lymphoblastenkultur (MKT-He-Zellen) genommen.[+)]

Die Etablierung dieser lymphoblastären permanenten Zell-Linie gelang 1972 aus dem peripheren Blut eines Patienten mit Infectiöser Mononucleose.

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterscheiden sich die MKT-He-Zellen nicht wesentlich von anderen humanen lymphoblastoiden Zell-Linien. Auch in ihrem cytochemischen Verhalten entsprechen die MKT-He-Zellen Lymphoblasten. Immunfluoreszensuntersuchungen mit gereinigten Anti-Ig-Seren zeigten, daß die Zellen auch funktionell in die B-Zell-Reihe eingeordnet werden können (42).

Diese Eigenschaften lassen diese Zellen zu vergleichenden Untersuchungen mit nicht proliferierenden Leukozyten des peripheren Blutes als besonders geeignet erscheinen.

+) Für die Überlassung dieser Zellen danke ich Herrn Professor Dr. K. Wilms, Med. Klinik Tübingen.

2.2 Präparation der Zellen des peripheren Blutes

2.2.1 Leukozytenpräparation

60 ml Vollblut werden, direkt aus der Vene entnommen, in jeweils einem graduiertem, silikonisiertem Reagenzglas aufgefangen, in das zuvor Heparin (10 E/ml) gegeben wurde. Anschließend mehrmaliges Kippen. Danach werden dem 5 ml einer Dextran-Glucose-Lösung (6% Dextran, 0,8% Glucose, 0,09% NaCl) hinzugegeben. Nach gutem Mischen wird dies überführt in silikonisierte Glasröhren (Innendurchmesser 9 mm) und über 75 Min. bei 37 Grad Celcius inkubiert. Anschließend wird der Überstand, in dem sich die Leukozyten (Granulozyten und mononucleäre Zellen) befinden, vorsichtig mit Pasteurpipetten abgehebert und in Zelluloseröhrchen überführt.
Anschließend Suspension in 3-facher Menge Eagle-Medium (Difco). Ab diesem Arbeitsgang wird nur noch bei +4 Grad Celcius gearbeitet (Eisbad, Kühlraum). Danach wird 20 min x 30 g (= 900 upm) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment aufgeschüttelt, in Eagle-Medium suspendiert und der Inhalt der vormals 4 Zelluloseröhrchen in eines vereint. Die Suspension wird dann 10 min bei 60 g (= 1300 upm) zentrifugiert. Dann erneute Suspension des Sediments in 3 ml kalter Inkubationslösung (zusammengesetzt aus 5 ml Eagle-Medium Nr. 5674-72, 30 µl Glutamin 5%, 0,5 ml Pferdeserum, 150 µl Heparin-Lösung). Dann folgt das Zählen der Zellen und sofern nicht besonders vermerkt, die Einstellung auf 5×10^7 Zellen / 2 ml Medium. Die Leukozytenausbeute aus 60 ml Vollblut beträgt $5-8 \times 10^7$ Zellen. Dabei entfallen auf einen Leukozyten 1 -3 Erythrozyten und 1 - 2 Thrombozyten.

2.2.2 Erythrozytenpräparation

Aus der Erythrozytenschicht des Dextransediments wird ca 1 ml aufgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen mit ca 10 ml Eagle-Medium vermischt. Dann wird in der Servall-Zentrifuge 3 x 5 min bei 3000 upm zentrifugiert. Dazwischen wird jedesmal wieder der Überstand verworfen und mit Eagle-Medium aufgefüllt. Anschließend Zäh-

len der Zellen und Einstellen auf 5 x 10^7 Zellen / 2 ml. Die so gewonnene Erythrozyten-Präparation enthält keine Verunreinigung.

2.2.3 Thrombozytenpräparation

Der nach Dextran-Sedimentation erhaltene buffy-layer enthält neben den Leukozyten auch die Thrombozyten. Zur Gewinnung der Thrombozyten wird diese Schicht abgehebert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit Eagle-Medium aufgefüllt. Nach Zentrifugation über 20 min bei 900 upm (= 30g) befinden sich die Thrombozyten im Überstand. Dieser Überstand wird dann mit der Pasteurpipette abgehebert, mit Eagle-Medium aufgefüllt und zweimal mit 10 min x 80 g gewaschen und abschließend 20 min x 270 g zentrifugiert. Das Sediment wird dann in Medium suspendiert, gezählt und eingestellt auf 5 x 10^7 Zellen / 2 ml. Diese Zellpräparation ist frei von Erythrozyten und Leukozyten.

2.2.4 Inkubation der peripheren Leukozyten bzw. Kulturzellen mit ^{32}P

Als Inkubationsmedium wurde ein minimal phosphathaltiges Eagle-Medium (150 mg NaH_2PO_4 / l, Difco Best.Nr. 5674) gewählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes und des radioaktiven Zerfalls lag die spezifische Aktivität des $NaH_2{}^{32}PO_4$ (New England Nuclear, radiochemisch rein) bei 12 - 24 µCi/mMol. Je 2 ml der Zellsuspension (ca 5 x 10^7 Zellen) werden im Warburg-Apparat bei 37 Grad Celcius nach 5-min. Vorinkubation und anschließender Zugabe von ^{32}P (30 - 60 µCi) 0,5 bis 8 Stunden inkubiert.

Danach wird die Zellsuspension sofort durch ein Millipore-Filtersystem (Porenweite 1,2 µ, Durchmesser 12 cm) filtriert und zur Entfernung von überschüssigem ^{32}P mit ca 500 ml eiskalter isotonischer Glucoselösung nachgewaschen.

Die Cytolyse erfolgt durch Einbringen des Filters mit den darauf befindlichen Zellen in eiskalte 1N Essigsäure (Zeitaufwand vom Inkubationsende bis zur Cytolyse: 2-3 Min.). Die Cytolyse wird durch viermaliges Einfrieren und Auftauen vervollständigt.

2.2.5 Trennung der Nucleotide und Messung des Einbaus

Das Cytolysat wird lyophilisiert und der Rückstand in 5 ml 0,04 N Triäthylammoniumacetat-Puffer, pH 4,7, suspendiert und 1 Stunde hochtourig in der Servall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird quantitativ dekantiert. Die nucleotidhaltige Lösung wird dann in Modifikation der Methode von CALDWELL (5) mittels DEAE-Sephadex A 25 (Säule 6 x 45 mm) mit einem Elutionspuffer (1 N Triäthylammoniumformiat, 1,4 N Triäthylammoniumacetat, pH 4,7) weiter gereinigt. Anschließend Messen der einzelnen Fraktionen im Spektralphotometer und Vereinigen der nucleotidhaltigen Fraktionen. Diese werden dann lyophilisiert. Das Lyophylisat wird in 1 ml Aqua bidest. gelöst. 700 - 800 µl dieser Lösung und zusätzlich je 10 mµMol unmarkierter Vergleichsnucleotide werden mittels einer in einen "Perfusor" (Braun, Melsungen) eingespannten Hamilton-Spritze unter Kaltlufttrocknung innerhalb von 6-8 Stunden kontinuierlich auf eine Dünnschichtchromatographiefolie (Polygram CEL 300 PEI, 20 x 20 cm, Macherey und Nagel, Düren) aufgetragen. Der Startpunkt erreicht dabei einen Durchmesser von 6-8 mm.
Die zweidimensionale Auftrennung erfolgt dann nach der Methode von NAZAR u. Mitarbeiter (20) mit 1 N LiCl / 1 N Essigsäure bzw. 3 N Ammoniumacetat / 5% Borsäure. Vor Entwicklung der Platte in der zweiten Richtung wird diese für 15 Min. in 500 ml Methanol gewaschen und anschließend im Exsiccator getrocknet. Dasselbe erfolgt nach Abschluß der zweidimensionalen Auftrennung. Die getrennten Nucleotide werden durch Fluoreszenz bei 254 nm lokalisiert.

Zur Dokumentation wird jetzt eine genaue Kopie der Platte mit der Lokalisation der Nucleotide angefertigt. Danach werden die Flecke ausgeschnitten und die Nucleotide durch 30-minütiges Schwenken in 500 µl 0,7 M $MgCl_2$ - 2 M Tris-HCl, pH 7,4 (100/1, v/v) quantitativ eluiert (24).

Dann folgt die qualitative Analyse durch Vergleich von R_F- Werten und UV - Spektren mit Referenzsubstanzen. Zur Messung im Spektral-

photometer wird das Eluat vorher in beschriftete Eppendorf-Zentrifugen-Röhrchen überführt und 3 x 2 Min. zentrifugiert. Nach der photometrischen Bestimmung wird erneut zentrifugiert und von dem Überstand werden 250 µl in 10 ml Scintillationslösung gegeben. Die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität erfolgt im Tricarb Liquid Scintillation Counter.

2.2.6 Fluorometrische ATP-Bestimmung +)

Vollblut wurde aus der ungestauten Armvene durch Einrühren in eiskalte 6%-ige Perchlorsäure enteiweißt (Verhältnis Perchlorsäure : Blut 4:1, v/v).

Bei Untersuchung des ATP-Gehalts von Zellpräparationen wurde ein Verhältnis von 2 Teilen Perchlorsäure zu 1 Teil Suspension gewählt.

Nach 10-minütiger hochtouriger Zentrifugation wurde mit 5 M K_2CO_3 gegen Methylorange bis zum Farbumschlag titriert.

Die fluorometrische enzymatische Substratsbestimmung erfolgt am Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzaufsatz und Kompensationsschreiber (Primärfilter 313 plus 366 m µ, Sekundärfilter 430-470 m µ).

Für die Hexokinase-Reaktion wurde weitgehend die Methode von ESTABROOK u. Mitarbeiter übernommen (9).

Enzymansatz: 50 mM Triäthanolamin, pH 7,4, 10 mM KCl. 10 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10 mM Glucose, 0,1 mM NADP, 0,25 µg G6P-DH (spez. Aktivität 350 U/mg), 2,5 µg HK (spez. Aktivität 140 U/mg) 50 µl Probe.

Gesamtvolumen 2 ml (Alle Enzyme und Coenzyme Fa. Boehringer, Mannheim).

+) Die Ergebnisse aus dieser Bestimmung wurden von Herrn Dr. O. Barth übernommen.

2.2.7 Statistische Methoden

Für die Meßergebnisse wurde eine Normalverteilung angenommen und die Mittelwerte für ungepaarte Reihen mit $\pm$ s errechnet. Die Signifikanzen wurden nach der Student-Methode mit Hilfe des t-Testes errechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Vitalitätsprüfung

Voraussetzung für die Untersuchung des ^{32}Phosphateinbaus in Leukozyten ist eine möglichst reine Zellisolierung sowie die Erhaltung der Vitalität der Zellen in Verlauf der Präparation und Inkubation. Nach Untersuchungen von BARTELMAI und Mitarbeiter (1) kann durch hypotonen Schock eine Restkontamination der Leukozyten mit Erythrozyten bzw. Thrombozyten nicht beseitigt werden. In Vorversuchen konnten wir diese Befunde auch für Ammoniumchlorid als Hämolysemittel bestätigen.

Da LICHMANN u. Mitarbeiter (15) nach Exposition von Leukozyten in 0,3 %-iger, phosphatgepufferter Kochsalzlösung nach vorausgehender Volumenzunahme bereits nach 20 Sekunden eine Lyse der Leukozyten beobachteten, haben wir in der Folge zum Zweck der Erhaltung der Zellvitalität auf hämolysierende Agentien verzichtet. Die nach Waschen erhaltene Zellsuspension enthielt so im Mittel auf einen Leukozyten 1 - 3 Erythrozyten und 1 - 2 Thrombozyten. Eine Korrektur der in der Mischpopulation erhaltenen Meßwerte ist möglich unter Berücksichtigung der in gesonderten Versuchen für Erythrozyten bzw. Thrombozyten gewonnenen Werte.

Neben einem möglichst schonenden Isolierverfahren war die Frage zu klären, ob die Zellen während der Inkubation (bis zu 8 Stunden) geschädigt werden und damit die zu untersuchenden Stoffwechselleistungen ungünstig beeinflußt werden. Als Test hierfür wurde die Nigrosin-Anfärbung nach KALTENBACH u. Mitarbeiter (13) gewählt. Dabei zeigte sich (Tab. 1 a), daß sich nach 5- bzw. 8-stündiger Inkubation 4,1 % bzw. 1,8 % der Leukozyten mit Nigrosin anfärben. Der für die Erythrozyten entsprechend durchgeführte Test zeigt keine Anfärbbarkeit mit Nigrosin (s. Tab. 1 b).

Tab 1 a Fluorometrisch bestimmter ATP Gehalt von Leukozyten bei unterschiedlicher Inkubationsdauer

Inkubations-dauer	Hexokinase-Reaktion mμMol ATP/10^7 Zellen	%	n	Nigrosin-Test positiv
0 Std	22,04 ± 4,15	100	5	2,1 %
2 Std	12,87 ± 4,55	58,4	6	1,7 %
5 Std	16,18 ± 7,20	73,4	6	4,1 %
8 Std	19,58 ± 9,55	88,8	6	1,8 %

Tab 1 b Fluorometrisch bestimmter ATP-Gehalt von Erythrozyten bei unterschiedlicher Inkubationsdauer

Inkubations-dauer	Hexokinase-Reaktion mμMol ATP/10^7 Zellen	%	n	Nigrosin-Test positiv
Vollblut	1,47 ± 0,30	–	7	
0 Std	1,29 ± 0,21	100	3	0 %
2 Std	0,70 ± 0,23	54,3	6	0 %
5 Std	0,58 ± 0,33	45,0	6	0 %
8 Std	0,35 ± 0,14	27,1	5	0 %

In der Vorstellung, durch die ATP-Bestimmung genauere Aufschlüsse über den Energiepool der Zellen zu erhalten, wurde dieses fluorometrisch im enzymatischen Test bestimmt (Hexokinasereaktion, Tab. 1 a, b). Nach den Ergebnissen der Hexokinase-Reaktion enthält die Leukozytenpräparation vor Inkubation 22,04 $\pm$ 4,15 mμM ATP (Erythrozyten 1,29 $\pm$ 0,21 mμM ATP / 10^7 Erythrozyten). Diese Werte entsprechen den in der Literatur mitgeteilten (8, 33).

Nach zwei Stunden Inkubation fällt das ATP der Leukozyten auf 58,4 % des Ausgangswertes (Erythrozyten 54,3 %), nach 5 bzw. 8 Stunden steigt dieses bei Leukozyten wieder auf 73,5 % bzw. 88,8 % an, wäh-

rend es bei Erythrozyten weiter abfällt (45,0 % bzw. 27,4 %). Bezüglich der Zellvitalitätsprüfung ist aufgrund dieser Ergebnisse der ATP-Bestimmung im Vergleich zur Nigrosin-Testung eine wesentlich größere Aussagekraft zuzuschreiben. Den ATP-Anstieg der Leukozyten möchten wir als Adaptionsphänomen an die Inkubation bewerten. Allerdings dürfte die im Nigrosin-Test nachzuweisende Devitalisierung bei Unterschreitung einer kritischen ATP-Konzentration der Einzelzelle eintreten, die im enzymatischen Test nicht erfaßt werden kann. Es darf jedoch bereits hier darauf hingewiesen werden, daß Leukozyten nach 5-stündiger Inkubation den höchsten ^{32}P-Einbau aufweisen, zu einer Zeit, in der die ATP-Konzentration 73,4 % des Ausgangswertes beträgt. Nach diesen Ergebnissen ist eine Beeinträchtigung von Phosphorylierungsreaktionen unter den gewählten Inkubationsbedingungen nicht wahrscheinlich.

3.2 Chromatographische Identifizierung der Nucleotide

Abbildung 1a zeigt ein zweidimensionales Chromatogramm von Reinsubstanzen, für die im Inkubationsversuch eine ^{32}P-Markierung nachgewiesen wurde. Bei 3 Flecken besteht eine Beladung mit je 2 Nucleotiden, die mit der vorliegenden Methode nicht getrennt werden können. Das entsprechende Radiochromatogramm eines Inkubationsversuches enthält die Abbildung 1b. dGTP und TDP enthalten Verunreinigungen durch hochaktive Substanzen (x_1 und x_2), die nicht näher analysiert wurden. Eingesetztes ^{32}P verunreinigt die Substanzen TMP, UMP und CMP.

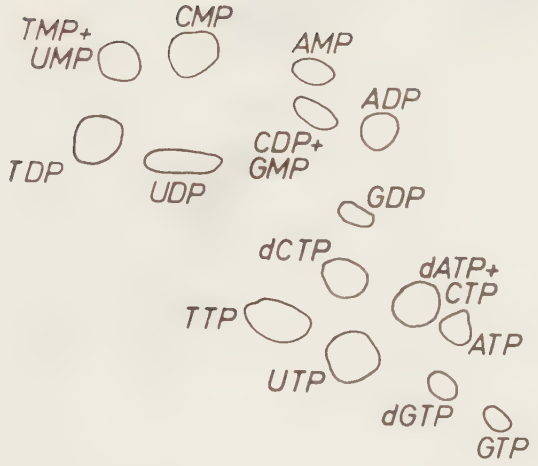

Abb. 1a Zweidimensionale Trennung von Nukleotiden durch PEI-Cellulose-Dünnschichtchromatographie.
Einzelheiten s. Text

Abb. 1b Autoradiogramm P^{32} markierter Nukleotide aus Leukozytenextrakt.

3.3 Prüfung des ^{32}P-Einbaus unter verschiedenen Bedingungen

In Abbildung 2a ist die Abhängigkeit des ^{32}P-Einbaus von der eingesetzten Aktivitätsmenge verzeichnet, wobei bis zur maximalen Aktivität von 120 µCi (entspr. 50 µl ^{32}P) eine Linearität des Einbaus beobachtet wurde. Steigende Leukozytenzahlen zeigen bis zur maximal geprüften Leukozytenmenge von 14×10^8 Zellen einen proportionalen Einbau in Nucleotide (Abb. 2b).

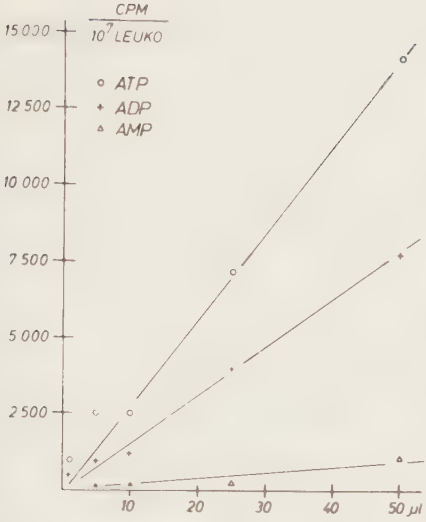

Abb 2a Einbau von P^{32} in Nukleotide von Leukozyten in Abhängigkeit zur eingesetzten Radioaktivität
Inkubationszeit 2 Stunden

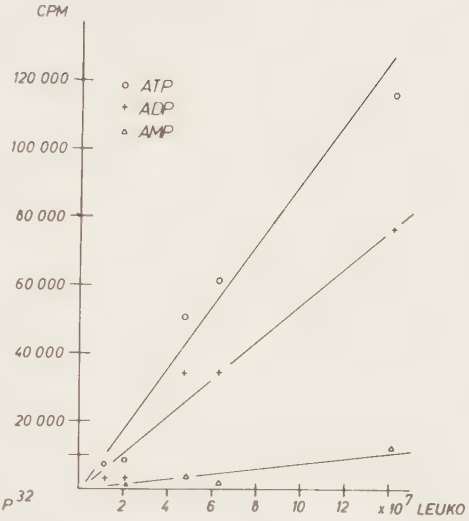

Abb 2b Einbau von P^{32} in Nukleotide von Leukozyten in Abhängigkeit zur Leukozytenzahl
Inkubationszeit 2 Stunden

Zur Ermittlung der Einbauraten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurden Leukozyten nach 5-minütiger Vorinkubation bis zu 8 Stunden mit radioaktivem Phosphat inkubiert (Abb. 3). Dabei zeigt sich für die meisten Nucleotide eine zunehmende ^{32}P-Markierung, die nach 5 Stunden ein Maximum erreicht, um dann bis zu 8 Stunden Inkubation kontinuierlich wieder abzufallen.

Da es möglich ist, daß das bei 5 Stunden erreichte Einbau-Maximum nicht einer echten Synthesesteigerung entspricht, sondern durch Adaptionsvorgänge während der Inkubation verursacht wird, wurde der ^{32}P-Einbau nach 5-stündiger Vorinkubation nochmals überprüft.

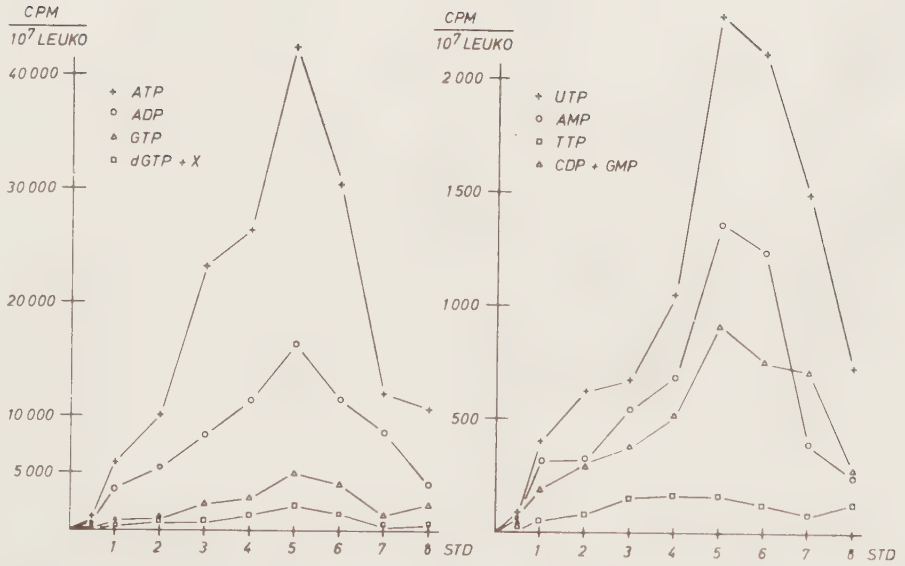

Abb 3 Einbau von P^{32} in Nukleotide von Leukozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Wie Abbildung 4 zeigt, wird auch unter diesen Bedingungen 5 Stunden nach Phosphat-Zugabe ein maximaler Einbau erreicht.

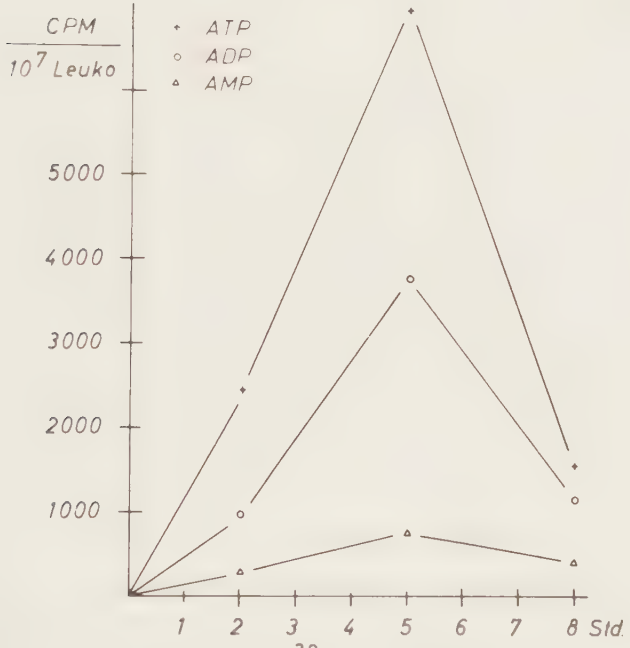

Abb. 4 Einbau von P^{32} in Nukleotide von Leukozyten nach 5 Std. Vorinkubation

3.4 Einbau von ^{32}P in Nucleotide von Blut- und Kulturzellen

Die Mittelwerte der Nucleotidmarkierung aus 9 Versuchen bei einer Inkubationszeit von 5 Stunden zeigt die Tabelle 2 a. Dabei hat ATP bei Leukozyten mit 26,77 x 10^3 cpm / 10^7 Zellen die höchste Aktivität. Diesem folgen in der Reihenfolge abfallender Markierung ADP, GTP, dGTP + x_1, TDP + x_2, UTP, dATP + CTP, AMP, UDP, CDP + GMP, dCTP und TTP.

Tab 2 a Einbau von P^{32} in Nukleotide von Blut- und Kulturzellen bezogen auf 10^7 Zellen (10^3 cpm/10^7 Zellen) mit Standardabweichung (s) und Signifikanz (p)

		GTP	dGTP + X_1	UTP	TTP	ATP	dATP +CTP	dCTP	GDP	ADP	CDP +GMP	UDP	TDP + X_2	AMP
Leukozyten		3,56	2,97	1,97	0,15	26,77	1,43	0,20	0,96	11,35	0,68	0,84	2,95	0,94
	s	±2,18	±1,73	±1,27	±0,07	±18,03	±0,58	±0,12	±0,70	±8,48	±0,40	±0,35	±1,40	±0,70
Kulturzellen		1,63	1,32	1,59	1,54	11,39	2,96	0,61	0,24	20,58	2,82	1,98	5,45	6,56
	s	±0,95	±0,82	±1,01	±0,88	±6,12	±1,03	±0,35	±0,09	±21,28	±1,46	±0,82	±3,59	±4,08
Leukozyten / Kulturzellen	p <	0,05	0,025	0,5	0,25	0,05	0,005	0,05	0,2	0,3	0,005	0,005	0,2	0,005
Erythrozyten		0,16	4,10	0,10	0,01	2,67	0,17	–	0,01	0,70	0,15	0,38	0,85	0,13
	s	±0,12	±2,47	±0,12	±0,004	±2,73	±0,22	–	±0,006	±0,62	±0,09	±0,22	±0,55	±0,10
Leukozyten / Erythrozyten	p <	0,005	0,3	0,02	0,02	0,005	0,001	–	0,01	0,005	0,005	0,02	0,02	0,02
Thrombozyten		0,02	0,01	0,01	–	0,15	0,01	–	–	0,04	–	–	0,02	0,01
	s	±0,02	±0,02	±0,02	–	±0,26	±0,01	–	–	±0,06	–	–	±0,01	±0,01
Leukozyten / Thrombozyten	p <	0,001	0,001	0,001	–	0,001	0,001	–	–	0,001	–	–	0,001	0,001

In gleicher Weise wurden nach 5 Stunden Inkubation Erythrozyten untersucht (Tab. 2 a), bei denen die mittlere ATP-Aktivität bei 2,67 x 10^3 cpm / 10^7 Zellen lag, was etwa 10% der Aktivität der Leukozyten entspricht. Die bei Thrombozyten gefundenen Werte liegen im Bereich der Nachweisgrenze. Diese Zellen dürften während der Inkubation devitalisiert sein, was nicht geprüft wurde.

Wie bereits oben erwähnt, müssen die bei Erythrozyten gefundenen Einbaugrößen zur Korrektur der vorliegenden Mischpopulation auf Leukozyten herangezogen werden.

Im Vergleich zu Leukozyten des peripheren Blutes waren die Einbaugrößen einer proliferierenden, humanen, lymphoblastoiden Zellkultur (MKT-He'Zellen) von besonderem Interesse. Nach 5 Stunden Inkubation mit radioaktivem Phosphat zeigte hier ADP mit einer mittleren Aktivität von 20,58 x 10^3 cpm / 10^7 Zellen die höchste Markierung (s. Tab. 2a). Das Einbaumuster in der Reihenfolge abnehmender Markierung ist: ATP, AMP, TDP + x_2, dATP + CTP, CDP + GMP, UDP, GTP, UTP, dGTP + x_1, dCTP und TTP.
Bei der statistischen Auswertung mittels t-Test wurden zwischen Leukozyten und Kulturzellen folgende Unterschiede gefunden: Die Triphosphate ATP, GTP und dGTP + x_1 zeigen bei Leukozyten im Vergleich zu den lymphoblastoiden Kulturzellen signifikant höhere Markierungen (p kleiner 0,05 bzw. 0,025). In die Nucleotide dATP + CTP, dCTP, CDP + GMP, UDP und AMP wird bei Kulturzellen im Vergleich zu Leukozyten aus dem peripheren Blut hochsignifikant mehr Phosphat eingebaut (p kleiner 0,005).

Bei kritischer Würdigung der zuletzt genannten Befunde ergibt sich die Möglichkeit, daß der nachgewiesene differente Phosphateinbau nicht einer echten unterschiedlichen Syntheseleistung entsprechen könnte. So ist es denkbar, daß bei zwei Zellpopulationen mit - unter optimalen Bedingungen - gleichem Einbauverhalten unter ungünstigen Inkubationsbedingungen, die z.B. den Energiestoffwechsel der einen Zellpopulation stärker beeinträchtigen als den der Vergleichspopulation, ein unterschiedlicher Phosphateinbau nachzuweisen ist. Dieser Effekt wäre insbesondere dann von Bedeutung, wenn die eingebaute Aktivität, wie oben geschehen, auf die Zellzahl bezogen wird. Bei einem solchen Vorgehen würde der Umstand übersehen, daß die niedrigeren Einbauraten der einen Zellpopulation durch ungünstige Beeinflussung des

Energiestoffwechsels dieser Zellen eingetreten sein könnte.

Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden in Tabelle 2b die Einbauraten der Zellen auf den im enzymatischen Test bestimmten ATP-Gehalt bezogen. Mit dieser Methode konnte lediglich der signifikant höhere ^{32}P-Einbau in Triphosphate von Leukozyten aus dem peripheren Blut (CTP, dGTP + x_1, UTP und ATP) bestätigt werden, wobei allerdings im Vergleich zu der auf die Zellzahl bezogenen Werte die Signifikanz zunahm. Am Beispiel von ATP sollen beide Bezugsgrößen gezeigt werden:
$26,77 + 18,03 \times 10^3$ cpm / 10^7 Zellen (s = 67 %) bzw.
$13,07 \pm 3,52 \times 10^3$ cpm / mµMol ATP (s = 27 %). Im Falle von ATP vermindert sich dabei die Streubreite der Standardabweichung (Varianz) von 67 % auf 27 %. Nach diesem Ergebnis zeigt sich deutlich, daß als günstigste Bezugsgröße die spezifische Aktivität einer Substanz zu wählen ist (cpm/mµMol). Mit Ausnahme von ATP konnte die Gesamtmenge der einzelnen Nucleotide nicht bestimmt werden, da diese bei einer Ausgangsblutmenge von 60 ml photometrisch nicht zu erfassen sind.

Tab 2 b Einbau von P^{32} in Nukleotide von Leukozyten und Kulturzellen bezogen auf den fluorometrisch bestimmten ATP-Gehalt der Zellen. (10^3 cpm/mµMol ATP) mit Standardabweichung (s) und Signifikanz (p)

	GTP	dGTP + X_1	UTP	TTP	ATP	dATP + CTP	dCTP	GDP	ADP	CDP + GMP	UDP	TDP + X_2	AMP
Leukozyten	1,85	1,63	1,17	0,10	13,07	0,99	0,11	0,60	6,93	0,42	0,63	1,70	0,56
s	±1,16	±1,23	±0,68	±0,10	±3,52	±0,76	±0,08	±0,37	±4,07	±0,32	±0,71	±1,08	±0,37
Kulturzellen	0,31	0,28	0,32	0,03	2,12	0,64	0,14	0,04	4,45	0,54	0,44	1,16	1,35
s	±0,22	±0,23	±0,32	±0,02	±1,14	±0,41	±0,11	±0,02	±5,36	±0,41	±0,28	±0,97	±1,20
Leukozyten / Kulturzellen p <	0,005	0,02	0,02	0,1	0,001	0,25	0,7	0,2	0,4	0,6	0,5	0,4	0,2

4. DISKUSSION

Zur Bereitstellung der für die Nucleinsäuresynthese notwendigen Vorstufen stehen Leukozyten zwei Stoffwechselwege zur Verfügung:
a) die Synthese von Pyrimidinen und Purinen aus kleinmolekularen Substanzen (de-novo Synthese) b) die Verwendung bereits vorhandener Nucleinsäurebasen bzw. deren Zucker- oder Zuckerphosphatverbindungen (salvage pathway).
Die Bedeutung der de-novo Synthese für den Nucleinsäurestoffwechsel von Leukozyten kann durch Bestimmung der Einbauraten z.B. von radioaktivem Aminoimidazolcarboxamid (35), Orotsäure (5, 35), Glycin (25, 26, 27, 28, 35, 44) und Formiat (22, 28, 34, 39, 44) verfolgt werden. Zur Bestimmung des salvage pathway wurden in der Vergangenheit die verschiedensten Nucleinsäurevorstufen eingesetzt (5, 16, 18, 35, 38, 41).

Es wurde bisher nicht eindeutig geklärt, ob ausgereifte Leukozyten des peripheren Blutes zur Synthese des Purinrings befähigt sind. Während WINZLER u. Mitarbeiter (44) einen durch Azaserin hemmbaren Einbau von Glycin - ^{14}C in die "gross protein fraction" feststellten, wurde die Purinsynthese von anderen Autoren (26, 27, 28, 10, 14, 35) selbst bei chronischen Leukämien mit Ausschwemmung von unreifen Zellen für unbedeutend gehalten. Dagegen konnte bei Lymphoblasten (25, 26), PHA-stimulierten Lymphozyten (27) und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (36, 37) ein deutlicher Glycineinbau in Purin festgestellt werden. In ähnlicher Weise wird über nur geringe Formiat-Einbauraten bei reifen Leukozyten und bei unreifen Zellen chronischer Leukämien berichtet (28, 34, 39). Auch für Formiat ist bei akuten Leukämien (28, 39) und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen eine gute Utilisation festzustellen. Aus ihrem Stoffwechselverhalten schließen WILLIAMS u. Mitarbeiter (38), daß leukämische Leukozyten nur zu späten Reaktionsschritten der Purin-de-novo Synthese befähigt sind.

Für die Pyrimidinsynthese konnten COOPER u. Mitarbeiter (5, 6) an CML-Zellen zeigen, daß trotz eines steigenden Angebots von radioaktivem Thymidin und einer entsprechend zunehmenden Markierung von Thymidinnucleotiden der aus der de-novo Synthese stammende Thymidinnucleotidpool unbeeinflußt bleibt. GALLO zeigte an ALL-Lymphoblasten, daß exogen zugeführtes TMP nicht direkt für die Zelle verfügbar ist, da es die Zellmembran nicht passieren kann. Es wird an der Membran zum Thymidinnucleosid metabolisiert und innerhalb der Zelle wird dieses dann wieder zum Nucleotid aufgebaut (10).

Die Mengenrelationen säurelöslicher Nucleotide von normalen und pathologischen weißen Blutzellen wurden in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren untersucht (19, 29). Nach EHRHARD u. Mitarbeiter (8) ist bei Lymphozyten von Patienten mit chronischer Lymphadenose im Vergleich zu normalen Leukozyten ATP signifikant vermindert. MAI u. Mitarbeiter (17) berichten über eine Verminderung weiterer Nucleotide sowohl bei chronisch lymphatischen wie auch chronisch myeloischen Leukämien. Nach diesen Autoren ist z.B. der unterschiedliche Nucleotidgehalt von Lymphozyten und Granulozyten nicht auf die differente Zellgröße, sondern auf verschiedenartige Stoffwechselleistungen einschließlich Nucleinsäuresynthese zu beziehen.
Bei diesen Arbeiten wie auch der vorliegenden fallen die relativ großen Schwankungsbreiten der Meßwerte auf. SCOTT (28) konnte bei einem Patienten mit akuter Leukämie bei mehrfachen, über Wochen durchgeführten Einbauversuchen Abweichungen feststellen, die die methodisch bedingte Fehlerbreite (Doppelversuche) deutlich überschritten. Der Patient erhielt keine Therapie, der hämatologische Status blieb während der Versuchszeit unverändert.
Die Bestimmung des Nucleotidgehaltes bietet lediglich einen Einblick in die Mengenrelation dieser Substanzen, nicht jedoch in die Stoffwechselaktivität der Zellen. Deshalb wurde der Einbau von radioaktivem Phosphat in säurelösliche Nucleotide untersucht. Zuvor war die unversehrte Stoffwechselaktivität der Zellen unter den Inkubationsbedingungen zu sichern.

Unter den gewählten Bedingungen fiel nach 2 Stunden der ATP-Gehalt auf 58,4 % des Ausgangswertes und stieg nach 5 bzw. 8 Stunden auf 73,4 bzw. 88,8 % an. Dabei erreichen die Zellen nach 5 Stunden maximale Einbauraten. Mit Ausnahme einzelner, wahrscheinlich präparativ vorgeschädigter Zellen (pos. Nigrosintest) ist für die überwiegende Mehrzahl der Zellen die Erhaltung der Stoffwechselaktivität wahrscheinlich. Eine artefizielle Beeinflussung des Nucleotidstoffwechsels ist nicht anzunehmen, da die Nucleotidmarkierung bei Inkubationszeiten von mehr als 5 Stunden bei weiter ansteigendem ATP-Gehalt der Zellen abfällt. Diese Annahme wird zusätzlich gestützt durch das unveränderte Einbauprofil nach 5-stündiger Vorinkubation.

Der maximale Phosphateinbau in säurelösliche Nucleotide wurde nach 5 Stunden beobachtet. SCOTT (28) fand bei CML-Zellen über 8 Stunden einen linearen Einbau von Adenin und Formiat in Nucleinsäuren-Purine bzw. Pyrimidine. Ebenso konnten WILMANNS und KEHR (40) nach Inkubation mit radioaktivem Thymidin und Desoxyuridin bei Leukozyten eines Patienten mit Blastenschub bei CML bis zur untersuchten maximalen Inkubationszeit von 4 Stunden einen linearen Einbau in die DNA nachweisen. Auch nach WILLIAMS (35) ist bei Glycin-^{14}C nach 240 Minuten noch kein Einbaumaximum erreicht. Dagegen berichten COOPER, PERRY und BREITMANN (4) bei CML-Leukozyten nach Inkubation mit Thymidin-^{3}H über eine maximale Markierung von TDP und TTP nach 5 Minuten, während TMP nach 30 Minuten noch keine Sättigung zeigt. Diese Unterschiede dürften mit der Wahl der untersuchten Nucleotide (Hydrolyse von Nucleinsäuren bzw. säurelöslichen Nucleotiden) und mit den durch die eingesetzten Isotope vorgewählten verschiedenen Synthesewege in Zusammenhang zu bringen sein.

Phosphat wird in der Zelle für eine Vielzahl von Reaktionen benötigt. Bei Kaninchenknochenmark und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen entspricht nach SMELLIE u. Mitarbeiter (30) die $^{32}PO_4$-Utilisation für

die Nucleinsäuresynthese in vitro und in vivo der von Adenin-^{14}C. Nach in vivo-Versuchen an jungen Ratten fanden SWICK und KOCH (32) 4 Stunden nach ^{32}P-Applikation ein Gleichgewicht zwischen anorganischem und organischem Phosphat. NYGAARD und RUSCH (21) berichten über eine hohe spezifische Aktivität von säurelöslichem ^{32}P 12 Stunden nach Hepatektomie bei Ratten. Während diese in der Folgezeit kontinuierlich abfiel, stieg 20 - 24 Stunden post operationem der Einbau in DNA-P maximal an. Aus diesem Verhalten kann auf die Utilisation der markierten Nucleotide für die DNA-Synthese geschlossen werden. Wir vermuten, daß es sich bei dem von uns festgestelltem Abfall der Nucleotidmarkierung bei Inkubationszeiten von über 5 Stunden um einen ähnlichen Mechanismus handelt (s.u.). Allerdings können zusätzliche katabole Prozesse z.B. für ATP nicht ausgeschlossen werden.

Ebenso wie bei regenerierender Rattenleber handelt es sich bei der lymphoblastoiden Zellkultur um ein proliferierendes Zellsystem. Es lag nahe, die Einbauwerte dieser Zellen mit denen von Leukozyten aus dem peripheren Blut zu vergleichen. Kulturzellen zeigen im Vergleich zu diesen bei den Triphosphaten dGTP, GTP und ATP signifikant niedrigere, bei dATP + CTP und dCTP signifikant höhere Phosphatmarkierungen. Bei den weiteren Nucleotiden hatten AMP, UDP sowie CDP + GMP ebenfalls eine höhere Aktivität aufzuweisen. Die höchste Aktivität hatte bei den Leukozyten ATP, bei den Kulturzellen ADP. Wie zwischenzeitlich festgestellt wurde (2), weisen Kulturzellen einen deutlichen Einbau Glycin-^{14}C in Purine auf. Offenbar können diese Zellen den Purinring selbst synthetisieren. Außerdem konnte bei diesen Zellen eine vermehrte Utilisation von Nucleotiden für die Nucleinsäuresynthese festgestellt werden. Andererseits zeigen normale Leukozyten des peripheren Blutes im Vergleich zu Kulturzellen eine deutlich gesteigerte Adenosin-^{14}C-Utilisation, weshalb für diese Zellen der salvage pathway von besonderer Bedeutung sein dürfte.

Eine sichere Interpretation der gefundenen Ergebnisse ist nicht möglich, insbesondere lassen sich hieraus keine Rückschlüsse ziehen auf ein bedeutendes differierendes Stoffwechselverhalten der beiden sich bezüglich der Proliferation unterscheidenden Zellsysteme.
Man kann nach dem Einbauverhalten vermuten, daß bei Kulturzellen neben dem salvage pathway die de-novo-Synthese offensichtlich ebenfalls eine Rolle spielt. In diesem Sinne könnte z.T. die höhere Markierung von Mono- und Diphosphaten gedeutet werden. Für die Verminderung der Triphosphat-Aktivität könnte - bei vergleichsweise kurzem Turnover - eine vermehrte Utilisation angenommen werden.

Bei Leukozyten des peripheren Blutes dürfte der de-novo-Synthese eine geringe Bedeutung zuzumessen sein, hier spielen katabole Prozesse die größere Rolle im Gegensatz zu den proliferierenden Kulturzellen, deren Stoffwechselprozesse anabole Tendenzen zeigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Biosynthese von Nucleinsäuren werden als Vorstufen Nucleotide benötigt. Zu deren Bildung stehen der Zelle zwei Stoffwechselwege zur Verfügung, nämlich die de-novo Synthese und der salvage pathway. Zur Untersuchung dieser unterschiedlichen Stoffwechselwege wurden als Vertreter einer nicht proliferierenden Zellpopulation Leukozyten des peripheren Blutes, als Vertreter eines proliferierenden Zellsystems lymphoblastoide Kulturzellen (MKT-He Zellen) gewählt. Beide Zellsysteme wurden nach entsprechender Präparation mit radioaktivem Phosphat inkubiert in der Vorstellung, daß mit der Messung des ^{32}P-Einbaus beide Stoffwechselwege und damit die Bruttosynthese erfaßt würden. Es wurde erwartet, daß sich durch Vergleich der Einbauraten in die Nucleotide der verschiedenen Zellpopulationen Rückschlüsse auf ein differierendes Stoffwechselverhalten ergeben würden.

Es zeigte sich, daß die Kulturzellen im Vergleich zu Leukozyten des peripheren Blutes bei den Triphosphaten dGTP, GTP und ATP signifikant niedrigere, bei dATP + CTP und dCTP signifikant höhere Phosphatmarkierungen aufweisen, ebenso bei den Nucleotiden AMP, UDP und CDP + GMP. Die höchste Aktivität zeigte bei den Leukozyten ATP, bei den Kulturzellen ADP.

Da lymphoblastoide Kulturzellen im Gegensatz zu peripheren Leukozyten zur Purin-de-novo-Synthese befähigt sind, wird vermutet, daß der unterschiedliche Phosphateinbau teilweise durch dieses Verhalten zu erklären ist. Ein unterschiedlicher Nucleinsäurestoffwechsel wird diskutiert, es lassen sich jedoch mit den gefundenen Ergebnissen keine konkreten Rückschlüsse ziehen bezüglich eines differierenden Stoffwechselverhaltens. Es läßt sich feststellen, daß wohl der Stoffwechsel der peripheren Leukozyten auf den Katabolismus ausgerichtet ist, während er bei den Kulturzellen eher anabole Tendenzen aufweist.

6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Carb-Asp	Carbamylaspartat
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CP	Carbamylphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
dADP	Desoxyadenosindiphosphat
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
dATP	Desoxyandeosintriphosphat
dCDP	Desoxycytidindiphosphat
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Dehydro-OA	Dihydroorotsäure
dGDP	Desoxyguanosindiphosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHU	Dihydrouracil
DHT	Dihydrothymin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUDP	Desoxyuridindiphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Hx	Hypoxanthin
OMP	Orotidinmonophosphat
OA	Orotsäure
PRPP	Phosphoribosyltransferase

T	Thymin
TDP	Thymidindiphosphat
TdR	Thymidin
TMP	Thymidinmonophosphat
TTP	Thymidintriphosphat
U	Uracil
UdR	Uridin
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) BARTELMAI, W., M. VETRELLA, C. ESCHENBACH und E. JEHN:
Leukozytenisolierung aus kleinen Blutvolumina.
Klin. Wochenschrift 49, 263 (1971)

2) BARTH, O.:
unveröffentlicht

3) BUDDECKE, E.:
Struktur und Biosynthese der Nucleinsäurebausteine in "Grundriß der Biochemie", 2. Aufl. de Gruyter Verlag Berlin 1971

4) CALDWELL, J.C.:
Jon-Exchange Chromatography of Tissue Nucleotides.
J. Chromatography 44, 331 (1969)

5) COOPER, R.A., S. PERRY und T.R. BREITMANN:
Pyrimidine Metabolism in Human Leukocytes.
I. CON-tribution of exogenous Thymidine to DNA-Thymidine and its Effect on Thyimidine Nucleotide Syntheses in Leukemic Leukocytes.
Cancer Res. 26, 2267 (1966)

6) COOPER, R.A., S. PERRY und T.R. BREITMANN:
Pyrimidine Metabolism in Human Leukocytes II.
Metabolism of the Thymidine Nucleotide Pools in Normal and Leukemic Leukocytes.
Cancer Res. 26, 2276 (1966)

7) DAVIDSON, S.D. und WINTER, T.S.:
Purine Nucleotide Pyrophosphorylases in 6-Mercapto-purinsensitive and -resistant human Leukocytes.
Cancer Res. 24, 261 (1964)

8) EHRHARD, A. und P. SCHWANDT:
NAD, ATP and Lipid Content in Normal and Leukemic Human Leukocytes before and after Cytostatic Therapy.
Enzyme 13, 77 (1972)

9) ESTABROOK, R.W., J.R. WILLIAMSON und R. FRENKEL in:
S.P. Colowick u. N.O. Kaplan, Methods in Enzymology vol. 10p.
Academic Press NY 1967

10) GALLO, R.C.:
Synthesis and Metabolism of DNA and DNA-Precusors by Human Normal and Leukemic Leukocytes.
Acta haemat. 45, 136 (1971)

11) GRASSL, M.:
in: A.V. Bergmeyer (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Bd. II, Weinheim 1970

12) HARBERS, E., G.E. DOMAGK und W. MÜLLER:
Nucleotidstoffwechsel in "Die Nucleinsäuren" 1. Aufl., Stuttgart: Thieme 1964

13) KALTENBACH, J.P., M.H. KALTENBACH und W.B. LYONS:
Nigrosin as a Dye for Differentiating Live and Dead Ascites Cells.
Exp. Cell. Res. 15, 112 (1958)

14) LAJTHA, L.G. and VANE, S.R.:
Dependence of Bone Marrow Cells on the Liver for Purine Supply.
Nature, Lond. 182, 191 (1958)

15) LICHTMAN, M.A. und R.I. WEED:
The Monovalent Cation Content and Adenosine Triphosphates Activity of Human Normal and Leukemic Granulocytes and Lymphocytes: Relationship to cell Volume and Morphologic Age.
Blood 34, 645 (1969)

16) LIEBERMANN, M.W., S. SELL und E. FARBER:
Desoxynucleoside Incorporation and the Role of Hydroyurea in a Model of Lymphocyte System for Studying DNA Repair in Carcinogenesis.
Cancer Res. 31, 1307 (1971)

17) MAI, St., E. ZDEBSKA, J. DASZYNSKI und J. RADISZEWSKI:
Free Nucleotides in Leukocytes in Normal Conditions and in Chronic Leukaemias.
Fol. Haematol., Leipzig 99, 157 (1973)

18) MUKHERJEE, A.B., R.G. WAITE, M.M. COHEN und R. BERNSTEIN:
Incorporation of Uridine-^{3}H and Sodium-Acetat-^{14}C in Lymphocytes Derived from Normal and Leukemic Individuals.
Cancer Res. 32, 1833 (1972)

19) NAKAI, G.S. und C.G. CRADDOCK:
Acid soluble Nucleotides in Leukemic Cells.
Cancer Res. 25, 575 (1965)

20) NAZAR, R.N., H.G. LAWFORD und J.T.-F. WONG:
An Improved Procedure for Extraction and Analysis of Cellular Nucleotides.
Anal. Bioch. 35, 305 (1970)

21) NYGAARD, O. und H.P. RUSCH:
Incorporation of Radioactive Phosphate into Nucleic Acids of Regenerating Rat Liver.
Cancer Res. 15, 240 (1955)

22) PERETTA, M., W. RUDOLPH, G. AGUIRRE und G. HODGSON:
The Metabolic Pattern of ^{14}C-Formate Incorporation in Vivo and in Vitro into Nucleic Acids of Normal Mouse Spleen and Bone Marrow.
Biochem. Biophys. Acta 87, 157 (1964)

23) PERRY, S. und GALLO, R.C.:
Physiology of Human Leukemic Leukocytes: Kinetic and Biochemical considerations. in GORDON Regulation of Hematopoesis, 1221 (Appleton-century-crofts, New York 1970)

24) RANDERATH, K. und RANDERATH, E.:
Jon-Exchange Thin-Layer Chromatography. XV. Preparation, Properties and Applications fo Paper-like PEI-Cellulose Sheets.
Chromatography 22, 110 (1966)

25) ROBERTS, D.W. und E.V. LOEHR:
Depression of Thymidilate Synthetase Activity in Response to Cytosine Arabinside.
Cancer Res. 32, 1160 (1972)

26) SCHOLAR, E.M. und P. CALABESI:
Identification of the Enzymatic Pathways of Nucleotide Metabolism in Human Lymphocytes and Leukemic Cells.
Cancer Res. 33, 94 (1973)

27) SCHWARZMEIER, J., K. MOSER und H. RAINER:
De novo Synthese von Adeninnucleotiden in Lymphozyten: Induktion durch Phytohämagglutinin.
Klin. Wochenschrift 50, 871 (1972)

28) SCOTT, J.L.:
Human Leukocyte Metabolism in Vitro. I.
Incorporation of Adenine-8-^{14}C and Formiate-^{14}C in the Nucleic Acids of Leukemic Leukocytes.
J. Clin. Invest. 41, 67 (1962)

29) SILBER, R.B., W. GABRIO, F.M. HUENNEKENS:
Studies on Normal and Leukemic Leukocytes III.
Pyridine Nucleotides.
J. Clin. Invest. 41, 230 (1962)

30) SMELLIE, R.M., R.Y. THOMMSON, R. GOUTIER und J.N. DAVIDSON:
The Incorporation of ^{14}Formate into Nucleic Acid Bases in Vitro and in Vivo.
Biochem. Biophys. Acta 22, 585 (1967)

31) SMITH, L.H., A. BAKER und M. SULLIVAN:
Üyrimidine Metabolism in Man II Studies of Leukemic Cells.
Blood 15, 360 (1960)

32) SWICK, R.W. und A.L. KOCH:
The Measurement of Nucleic Acid Phosphor Turnover in Rat Liver by the Constant Exposure Technique.
Arch. Biochem. Biophys. 67, 59 (1957)

33) VALENTINE, W.N., H.M. ANDERSON, D.E. PAGLIA, E.R. JAFFEE, P.N. KONRAD und S.R. HARRIS:
Studies on Human Erythrocyte Nucleotide Metabolism II. Nonspherocytic Anaemia, High Re Cell ATP and Ribosephosphate Pyrophosphokinase Deficiency.
Blood 39, 674 (1972)

34) WELLS, W. und R.J. WINZLER:
Metabolism of Human Leukocytes in Vitro. II Incorporation of Formiate-^{14}C into Cellular Components of Leukemic Human Leukocytes.
Cancer Res. 19, 1086 (1959)

35) WILLIAMS, A.M.:
Nucleic Acid Metabolism in Leukemic Human Leukocytes I. In Vitro Incorporation by Leukocytes from Chronic Granulocytic Leukemia.
Cancer Res. 22, 314 (1962)

36) WILLIAMS, A.M. und G.A. LEPAGE:
Purine Metabolism in Mouse Ascites Tumor Cells. I. Effect of Preformed Purins on in Vitro Incorporation of Glycine-2-^{14}C.
Cancer Res. 18, 548 (1958)

37) WILLIAMS, A.M. und G.A. LEPAGE:
Purine Metabolism in Mouse Ascites Tumor Cells.
II. In Vitro Incorporation of Preformed Purines into Nucleotides and Polynucleotides.
Cancer Res. 18, 554 (1958)

38) WILLIAMS, A.M., R.F. SCHILLING:
The in Vitro Incorporation of Nucleic Acid Precursors into Leukemic Human Leukocytes. I Metodology and Effects of Therapy on Incorporation in Vitro.
J. Lab. Clin. Med. 58, 76 (1962)

39) WILMANNS, W.:
Formiat-Aktivierung und de novo Synthese von Purinnucleotiden in Leukämiezellen und ihre therapeutische Beeinflussung durch 6-Mercaptopurin.
Z. ges. exp. Med. 147, 154 (1968)

40) WILMANNS, W. und D. KEHR:
DNS-Synthese in Leukämiezellen unter der Einwirkung von Methotrexat, 5-Fluorouracil und Cytosin-Arabinosid in vitro.
Pharmacol. Clin. 2, 161 (1970)

41) WILMANNS, W. und K. WILMS:
DNA-Synthesis in Normal and Leukemic Cells as Related to Therapy with Cytotoxic Drugs.
Enzyme 13, 90 (1972)

42) WILMS, K.:
DNS-Synthese in menschlichen Blutzellen. Biochemische Untersuchungen zur Therapie akuter Leukosen mit zytotoxischen Substanzen.
Thieme-Verlag, Stuttgart 1975

43) WILMS, K. und W. WILMANNS:
Effects of Cytotoxic Drugs on Enzymes of DNA Synthesis in Cultured Lymphocytic Cells. In: E. GERLACH, K. MOSER, u. W. WILMANNS (Hrsg.): Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes. IInd International Symposium, Vienna June 1972.

44) WINZLER, R.J., W. WELLS, J. SAPHIRA, A.D. WILLIAMS, I. BORNSTEIN, M.J. BURR und W.R. BEST:
Metabolism of Human Leukocytes in Vitro: II. The Effect of Several Agents on the Incorporation of Radioactive Formate and Glycine.
Cancer Res. 19, 337 (1959)

LEBENSLAUF

Am 31. Mai 1948 wurde ich, Gunther Hoffmann, als Sohn des Fritz Hoffmann und der Eva Hoffmann, geb. Cordes, in Lüneburg geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Lüneburg-Hagen und wechselte dann über auf das Johanneum in Lüneburg. 1963 verzog die Familie nach Leonberg. Dort besuchte ich das Albert-Schweitzer-Gymnasium, an dem ich am 20. Oktober 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 3. Januar 1967 bis 30. April 1968 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr.

Zum Sommersemester 1968 begann ich mein Studium an der Universität Tübingen. Am 4. Oktober 1969 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 23. September 1971 die ärztliche Vorprüfung mit Erfolg ab.

Am 29. Januar 1975 bestand ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Tübingen.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich vom April 1975 bis zum März 1976 am Kreiskrankenhaus Münsingen ab. Die Approbation als Arzt wurde mir am 5. April 1976 erteilt. Seither arbeite ich als Assistenzarzt am Krankenhaus in Münsingen.